

Il sistema pianta e lo stress idrico

INTRODUZIONE

Le piante hanno acquisito nel corso dei millenni la capacità di difendersi da stress biotici causati dall'attacco di vari microrganismi (tra cui virus, batteri, oomiceti, funghi) e macroorganismi (tra cui nematodi, insetti e acari), che possono portare a morte un numero rilevante di piante verdi e di coltivazioni d'interesse agrario, forestale e ornamentale con gravi conseguenze economiche e ambientali. Non meno pericolosi sono i fattori abiotici, come per es., la carenza di acqua, l'eccesso di calore, il freddo estremo, una forte salinità (spesso strettamente collegata alla carenza di acqua). Tutti questi fattori possono determinare l'instaurarsi di una malattia o di un disordine fisiologico nelle piante. Fortunatamente queste ultime sono generalmente in grado di difendersi mettendo in campo una serie di reazioni di difesa che, se sufficientemente tempestive e intense, possono portare all'instaurarsi di forme di tolleranza e di resistenza.

Per arginare i danni alle piante e alle coltivazioni a opera di stimoli biotici sono in uso da anni numerosi agrofarmaci che sfortunatamente nel tempo possono perdere di efficacia per l'insorgere di ceppi resistenti a essi nelle popolazioni dei patogeni oppure possono arrecare danni alla salute umana per i residui tossici nelle parte eduli o all'ambiente se sono usati in eccesso o se vi permangono. In alternativa sono state selezionate varietà per resistenza ai patogeni oppure, più recentemente, sono state sviluppate varietà genetica-

* *Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche – sezione Biochimica, Università di Firenze*

** *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente (DISPAA), Università di Firenze*

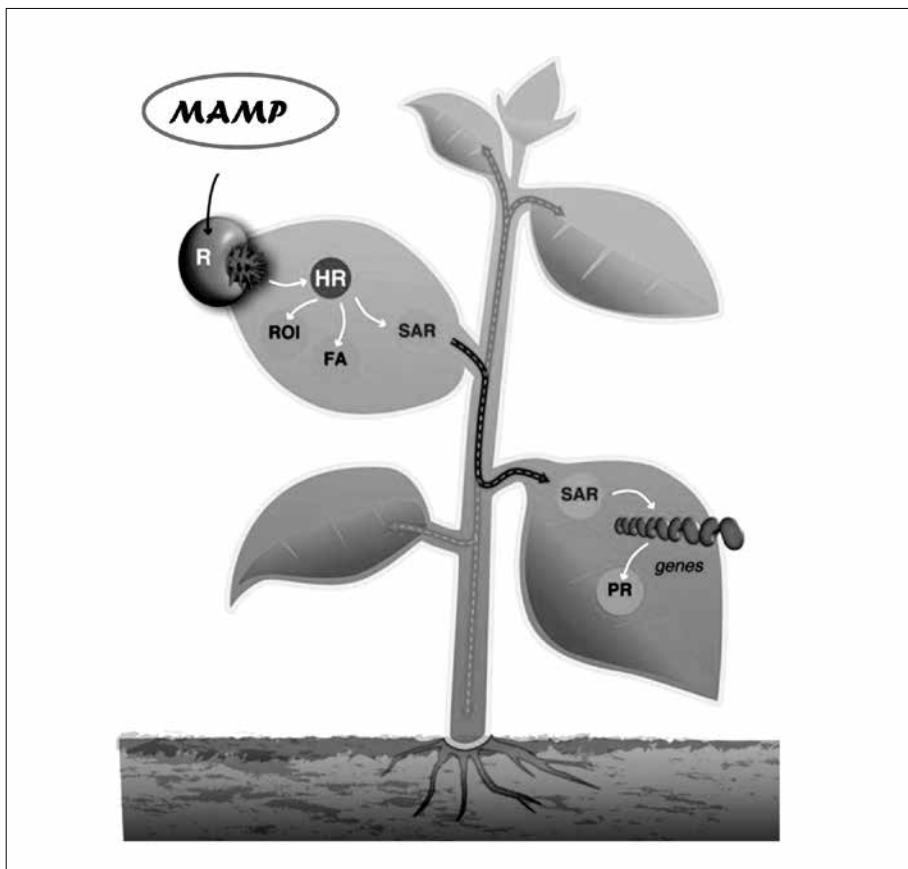


Fig. 1 Sistemi di difesa localizzata (HR, Hypersensitive Response) e sistemica (SAR, Systemic Acquired Resistance). R, recettore; PR, proteine di difesa ROI, Reactive Oxygen Intermediate (specie reattive dell'ossigeno) FA, fitoalessine. Modificato da: wps.prenhall.com

mente modificate con tutte le limitazioni legali e d'immagine che tale pratica comporta. Per quanto riguarda la difesa delle piante nei confronti degli stress abiotici, finora la linea maggiormente seguita o proposta è stata quella di sviluppare varietà resistenti selezionate con le tecniche di miglioramento genetico tradizionale oppure con le tecniche più moderne di ingegneria genetica.

Un approccio innovativo e promettente consiste nella stimolazione e/o nel potenziamento delle risposte di difesa delle piante mediante l'uso di molecole di origine microbiologica o vegetale chiamate "elicitori"; con questo termine si indicano quelle molecole che sono in grado di stimolare nelle piante una risposta immune, cioè di resistenza. Gli elicitori possono essere "esogeni", cioè molecole essenziali per i microorganismi e quindi conservate nei pato-

geni, non patogeni e saprofiti, e questo caso prendono il nome di MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns = strutture molecolari associate al microrganismo), oppure “endogeni”, cioè molecole vegetali rilasciate in seguito all’azione dei microrganismi sui tessuti vegetali (per esempio la degradazione dei costituenti parietali a opera di enzimi idrolitici) e chiamate DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns = strutture molecolari associate al danno) (Newman et al., 2013).

In seguito al riconoscimento di un segnale non-self, le cellule vegetali vanno incontro a una serie di modificazioni metaboliche che portano alla produzione di molecole antimicrobiche (come le fitoalessine), al rafforzamento della parete vegetale e alla produzione di una vasta gamma di peptidi e proteine di difesa chiamate proteine PR (Pathogenesis-Related = correlate con la patogenesi) caratterizzate da una forte attività antimicrobica diretta e indiretta. La percezione di un elicitore porta, inoltre, a innalzare il livello di resistenza della pianta contro attacchi futuri. Si parla di resistenza indotta che si instaura sia a livello locale (al sito di danno) che a livello sistemico, per cui la pianta si trova in uno stato di “priming” potendo innescare le risposte di difesa in modo più rapido e/o efficace ai successivi stress biotici o abiotici (fig. 1).

I SISTEMI DI DIFESA DELLE PIANTE

Una malattia non è *sic et simpliciter* l’effetto dell’azione di un fattore di stress sulla pianta; all’atto della sua insorgenza e al suo sviluppo concorrono più fattori i cui effetti possono sommarsi sia positivamente ad accelerare la patogenesi sia negativamente a rallentarla. Così come per gli uomini si è cominciato quindi a parlare di System Medicine per indicare che lo stato di malattia e guarigione non può essere affrontato e risolto se non considerando un insieme concomitante di fattori, anche nel campo del pianeta pianta potremmo parlare di System Agriculture per indicare quel fenomeno per cui diversi stimoli possono concorrere alla stato finale di salute di una pianta. Stimoli di stress di natura estremamente diversa, dai patogeni alla siccità al calore o al freddo eccessivi, a livello molecolare inducono un’attivazione di vie di segnalazione intracellulari che spesso convergono su medesimi mediatori o messaggeri che danno alla cellula l’informazione di difendersi per contrastare il fattore di stress (Piterková et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2013).

Le piante rispondono a questi stimoli attivando, per es., recettori di membrana che possono riconoscere gli elicitori (MAMP o DAMP) sul lato extracellulare o rispondere a segnali come variazioni di permeabilità e di flussi

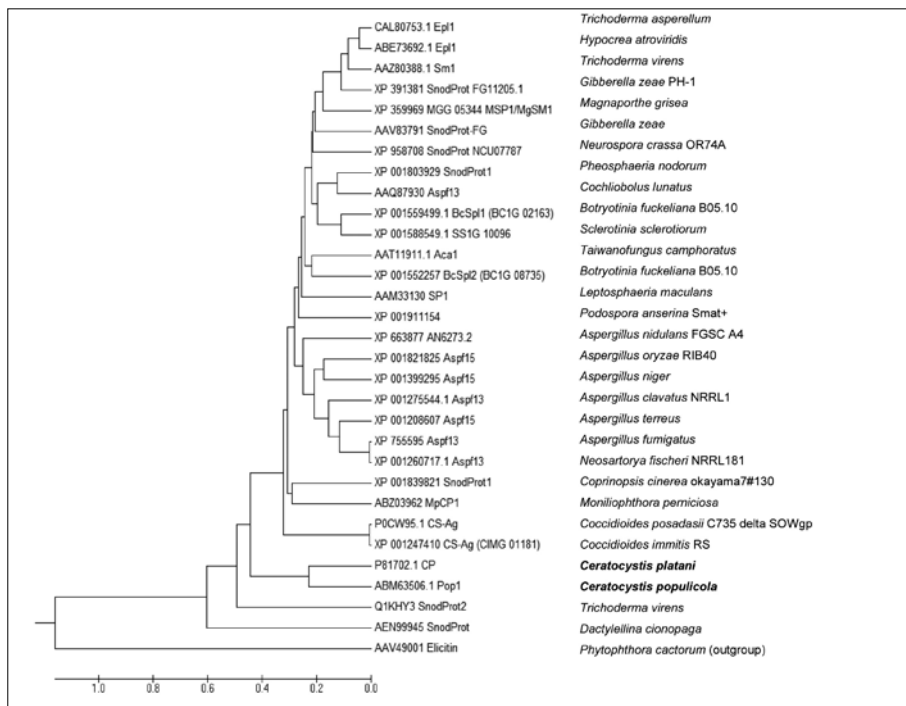


Fig. 2 Relazioni filogenetiche tra cerato-platanine. È stata presa in considerazione la sequenza della proteina matura, senza peptide segnale. CP e una sua proteina ortologa cerato-populina (Pop1) sono evidenziate in bold. Vengono riportati di fianco il numero di accesso della sequenza (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), il nome della proteina e il fungo da cui sono prodotte. La sequenza della elicitina prodotta a *Phytophthora cactorum* viene usata come outgroup

ionici. Questi recettori sono infatti proteine transmembraniche o citoplasmatiche in grado di attivarsi innescando così una via di segnalazione che porta all'attivazione di proteine enzimatiche intracellulari che condurranno infine alla produzione di metaboliti secondari di difesa (Rafiqi et al., 2012).

Tra questi mediatori intracellulari rivestono particolare importanza nelle piante così come negli animali, le ROS (Reactive Oxygen Species = specie reattive dell'ossigeno), che sono in grado di indurre sia morte cellulare localizzata al fine di prevenire il diffondersi della malattia, sia di segnalare ulteriormente alla cellula che c'è bisogno di attivare altre vie di difesa per impedire alla pianta di ammalarsi (Baxter et al., 2013). Le ROS infatti, e l' H_2O_2 *in primis*, sono in grado di attivare le MAPK, letteralmente "proteine attivate da mitogeni", identificate inizialmente negli animali, dove partecipano a processi di accrescimento cellulare e trasformazione neoplastica e successivamente nelle piante dove par-

tecipano alla trasduzione di diversi segnali e sono attivate durante le risposte di difesa (Kar et al., 2011). Le MAPK inoltre vengono ulteriormente attivate dalle ROS innescando una via di segnalazione che porta all'attivazione di fattori di trascrizione che hanno il compito di far produrre elevate quantità di proteine di difesa PR. Sono attualmente conosciute 14 famiglie di queste proteine (PR1-14) e ognuna di esse partecipa a una particolare via di difesa a vario livello, ad esempio le PR 3, 4, 8 e 11 sono chitinasi, la PR11 è una defensina e la PR 14 è una Lipid Transfer Protein, coinvolta nel rimodellamento della membrana. Tra le vie di difesa che vengono attivate a valle ricordiamo anche la produzione di fitormoni, come acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) ed etilene (ET), e di fitolessine, composti per lo più fenolici ad attività antimicrobica in grado di favorire anche l'adattamento a stress idrici (Ahuja et al., 2013).

La conclusione più evidente che possiamo trarre da queste osservazioni è quindi che la convergenza di risposte di difesa nelle piante è principalmente dovuta a una comunanza di mediatori di difesa intracellulari, primi tra tutti le ROS, ma anche le MAPK e i fitormoni.

Queste osservazioni portano a indirizzare la ricerca verso lo studio di quelle relazioni comuni che possono esserci tra stimoli biotici e abiotici. La domanda da porsi è la seguente: “È possibile aumentare la tolleranza di una pianta alla siccità aumentando le sue capacità difensive mediante il trattamento con elicitatori?”. Recenti linee di ricerca indicano che in alcuni casi si verifica un aumento di risposte di difesa in piante acclimatate ad uno stress abiotico o trattate con patogeni e viceversa suggerendo la possibilità di poter migliorare la resistenza allo stress idrico in piante trattate con elicitatori (Piterková et al., 2013; Ramegowda et al., 2013; Hanafy et al., 2013).

LA CERATO-PLATANINA COME MAMP FUNGINO

La cerato-platanina (CP, UniProt code P81702, PDB ID 2kqa) è una proteina secreta dal fungo ascomicete *Ceratocystis platani*, l'agente causale del cancro colorato del platano. A oggi, in banca dati la CP risulta la capostipite di una famiglia di proteine fungine prodotte sia da Ascomiceti che da Basidiomiceti e caratterizzate da un basso peso molecolare (11-13 kDa), da una elevata omologia di sequenza e dalla presenza di 2 ponti disolfuro intra-catena che rendono queste proteine particolarmente stabili e facilmente conservabili (Pazzagli et al., 1999; Pazzagli et al., 2006; de Oliveira et al., 2011). Tale famiglia ha preso appunto il nome di “Famiglia della cerato-platanina” ed è attualmente composta da più di 110 proteine recentemente identificate (fig. 2). Appartengono a questa famiglia

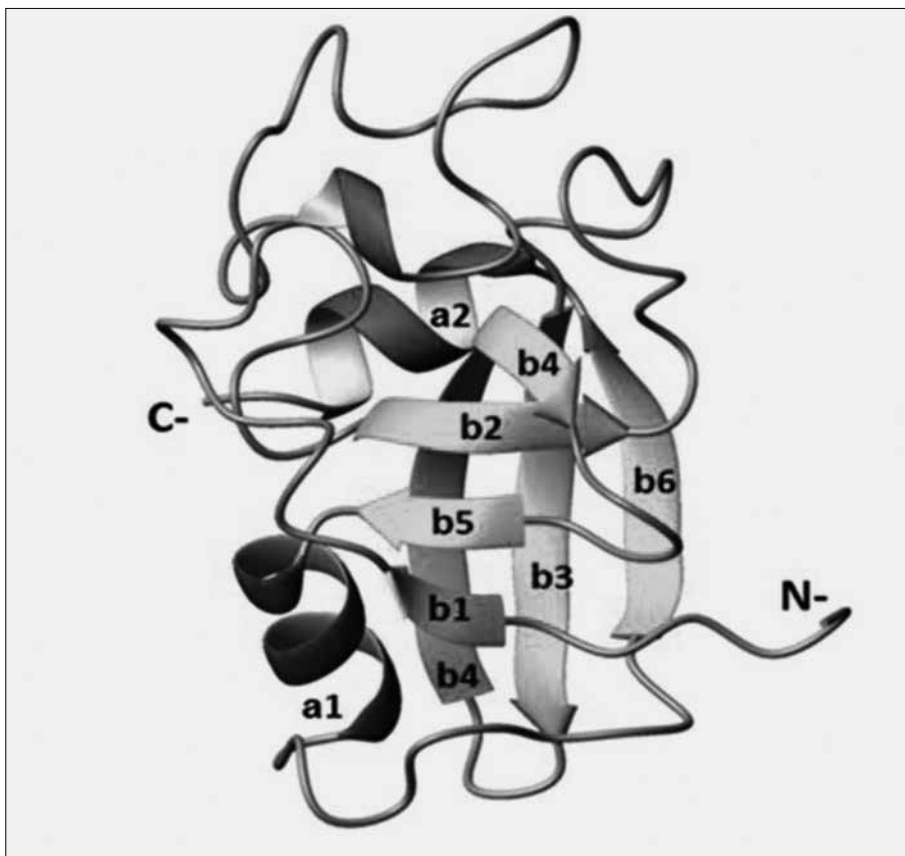


Fig. 3 Struttura tridimensionale della cerato platanina. La struttura è stata determinata mediante NMR multidimensionale. b 1-6: indicano i 6 β -sheets presenti nella struttura. a1 – a2: strutture ad α -elica. Modificata da: de Oliveira et al., J. Biol. Chem 2011

Snodprot1 prodotto da *Phaeosphaeria nodorum*, necessario per la virulenza; Sp1 prodotto da *Leptosphaeria maculans* che induce auto-fluorescenza nelle foglie di *Brassica napus* e MpCP1 in *Moniliophthora perniciosa*, in grado di indurre necrosi in foglie di tabacco e cacao. Inoltre, le proteine Sm1 e Epl1 prodotte da *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* inducono resistenza sistemica, mentre MgSM1 prodotta da *Magnaporthe oryzae* è in grado di indurre la risposta ipersensibile (HR) in foglie. La HR è anche indotta da BcSpl1, una proteina identificata recentemente e anche una delle più abbondanti nel secretoma di *Botrytis cinerea* (Pazzagli et al., 2014, Plant Science, in press).

La struttura tridimensionale della proteina è stata recentemente determinata mediante esperimenti di MNR multidimensionale che hanno indicato una

struttura compatta, chiamata *double ψ - β barrel* analoga a quella delle expansine, proteine prive di attività catalitica capaci di facilitare la rapida estensione e distensione della parete cellulare in modo da conservarne l'integrità, rompendo i legami non covalenti che uniscono i glucani (fig. 3). Sono presenti principalmente nei vegetali dove sono coinvolte nella crescita e nello sviluppo anche se recentemente sono state individuate proteine *expansin-like* nei batteri e nei funghi.

Dal punto di vista della funzione primaria, CP si è dimostrata essere coinvolta nei meccanismi di accrescimento e di rimodellamento del fungo produttore, come d'altra parte la sua struttura *expansin-like* lasciava presupporre (Bacelli et al., 2013a).

Dal punto di vista delle interazioni con piante, CP si è dimostrata essere in grado di attivare risposte tipiche della difesa primaria fra cui l'attivazione delle MAPK, l'overespressione di geni codificanti fattori di trascrizione (il fattore WRKY33) e di proteine coinvolte nella difesa come PR1, PR5, AGA (alkaline alpha galactosidase), UGT (uridinediphosphateglycosyltransferase) e la proteina 14-3-3: questi esperimenti sono stati condotti sia su platano che sulla pianta modello *Arabidopsis*, per cui è ragionevole proporre la CP come un MAMP generico, in grado di attivare risposte di difesa primaria (Bacelli et al., 2013b; Lombardi et al., 2013).

CP si è inoltre dimostrata in grado di indurre la sintesi di H_2O_2 e NO che sono appunto due molecole caratteristiche delle risposte di difesa e costituiscono il trait d'union tra le risposte di difesa innescate da stimoli biotici e le risposte innescate da stimoli abiotici come appunto la siccità o l'eccessivo calore (Lombardi et al., 2013; Baxter et al., 2013).

Questi dati sono ulteriormente confermati e allo stesso tempo ampliati dalla determinazione dell'induzione di resistenza: se CP viene pre-applicata sulla superficie di foglie di platano, viene inibita la crescita di conidi di *C. platani*; inoltre, CP è risultata efficace nel proteggere foglie di *Arabidopsis* dall'infezione di *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* (Scala et al., 2004; Bacelli et al., 2014, unpublished). Evidentemente le fitoalessine e/o le ROS in genere e l' H_2O_2 *in primis*, prodotti in seguito al trattamento di foglie con CP esercitano la loro azione antimicrobica sugli agenti infettanti finora testati (Ahuja et al., 2012; Baxter et al., 2013).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati finora ottenuti dallo studio di CP nell'interazione con piante indicano come questa proteina sia efficacemente in grado di agire da elicitore

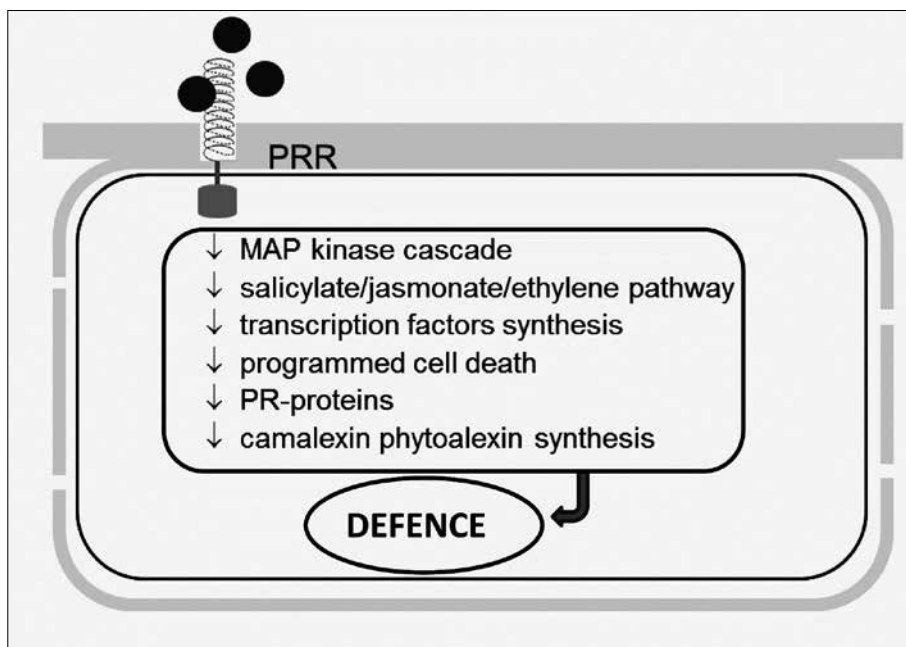


Fig. 4 *Rappresentazione schematica delle vie di difesa attivate da CP. Nello schema è indicata la CP (●) che interagisce con un ipotetico recettore (non ancora identificato) e attiva una via di segnalazione che porta all'attivazione delle MAPK, alla produzione di ROS, NO, Proteine di Difesa e Fitoalessine, tutti markers caratteristici di un'avvenuta attivazione delle vie di difesa*

generale di risposte di difesa e possa quindi essere a tutti gli effetti considerato un MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) in grado di indurre anche resistenza contro *Botrytis* e *Pseudomonas* quando usata in concentrazioni nell'ordine del micromolare (fig. 4). Contemporaneamente studi sulle relazioni struttura/funzione di CP hanno messo in luce come alcune regioni della proteina stessa e alcuni residui in particolare siano importanti nel determinare l'attività biologica della proteina stessa (de Oliveira et al., 2011; Baccelli et al., 2013a). Lo scopo ultimo di questo lavoro è quindi quello di identificare le regioni della proteina che sono particolarmente importanti per la sua attività biologica e di potenziare questa attività mediante ingegnerizzazione della proteina con tecniche di biologia molecolare e sintesi chimica di peptidi.

Una volta che abbiamo ottenuto un peptide attivo anche a concentrazioni micro-nanomolari che sia particolarmente stabile e solubile e quindi facilmente utilizzabile anche “in campo” potremo procedere al trattamento di piante e coltivazioni con questi elicitori che potremo definire di nuova generazione. Il fine ultimo è quello di innalzare il livello di base di resistenza di

una pianta in modo da renderla più resistente non solo a stimoli biotici, ma anche a stimoli abiotici come le drastiche variazioni climatiche a cui stiamo velocemente andando incontro. Ricordiamo infatti che a livello molecolare le vie di difesa innescate sia da stimoli biotici che abiotici convergono su pochi, specifici mediatori come le MAPK e l' H_2O_2 che la CP è proprio in grado di innescare un'over-produzione di questi mediatori.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia sentitamente tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione degli esperimenti rendendo possibile la presentazione di questa relazione. Un particolare ringraziamento va alla Dr. Priscilla Bettini, ricercatrice presso il Dipartimento di Biologia e ai PhD Simone Luti, Ivan Baccelli, Federica Martellini.

RIASSUNTO

Le piante sono in grado di difendersi da stimoli esterni (biotici e abiotici) innescando una serie di risposte di difesa che portano alla produzione di molecole antimicrobiche (come le fitoalessine), al rafforzamento della parete vegetale e alla produzione di una vasta gamma di peptidi e proteine di difesa. La percezione di un elicitore porta, inoltre, ad innalzare il livello di resistenza della pianta contro attacchi futuri. Importante peculiarità di questi meccanismi di difesa è la somiglianza tra quelli indotti da stimoli biotici e quelli dovuti a stimoli abiotici per una comunanza di mediatori di difesa intracellulari. Recenti linee di ricerca indicano un aumento di risposte di difesa in piante acclimatate o trattate con patogeni e viceversa, suggerendo la possibilità di poter migliorare la resistenza allo stress idrico in piante trattate con elicitori. La cerato-platanina, una proteina di origine fungina, si è rivelata agire da elicitore generale che attiva risposte di difesa in piante e induce resistenza contro *Botrytis* e *Pseudomonas*. Si propone quindi l'uso di questa proteina al fine di innalzare il livello di base di resistenza di una pianta in modo da renderla più resistente non solo a stimoli biotici, ma anche a stimoli abiotici come la siccità e le drastiche variazioni climatiche a cui stiamo velocemente andando incontro.

ABSTRACT

In the course of evolution, terrestrial plants have acquired the ability to detect the presence of potentially pathogenic microorganisms with which they come in contact. When plants recognize microbe-associated molecular patterns (MAMPs), they activate a defence system that is highly effective against the most potential pathogens. At molecular

level, this defence system is due to the activation of metabolic pathways that are similar to those activated as a result of an abiotic stimuli. Recent findings suggest a cross-talk between the defence responses activated by biotic and abiotic stimuli, and it has been noticed that acclimation of plants with an abiotic stress can impart tolerance to some biotic stresses and *vice versa*. In this respect, the fungal MAMP cerato-platanin, a low molecular weight non-catalytic protein, could be used in the treatment of plants and crops to increase their resistance to abiotic stimuli like drought. In fact, cerato-platanin is able to induce defences in plants such as the production of reactive oxygen species, the signaling of MAP kinases and the overexpression of genes related to the defence and it is able to induce resistance to *Botrytis* e *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFIA

- AHUJA I., KISSEN R., BONES A.M. (2012): *Phytoalexins in defense against pathogens*, «Trends Plant Science», 17, pp. 73-90.
- BACCELLI I., LUTI S., BERNARDI R., SCALA A., AND PAZZAGLI L. (2013a): *Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 98, pp. 175-184.
- BACCELLI I., SCALA A., PAZZAGLI L. AND BERNARDI R. (2013b): *Early transcription of defence-related genes in Platanus × acerifolia leaves following treatment with cerato-platanin*, «Biologia Plantarum», 3, pp. 571-575.
- BAXTER A., MITTLER R., SUZUKI N. (2013): *ROS as key players in plant stress signalling*, «Journal Experimental Botany», doi: 10.1093/jxb/ert375.
- DE OLIVEIRA A.L., GALLO M., PAZZAGLI L., BENEDETTI C.E., CAPPUGI G., SCALA A., PANTERA B., SPISNI A., PERTINHEZ T.A., CICERO D.O. (2011): *The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double- ψ -barrel fold and carbohydrate binding*, «Journal of Biological Chemistry», 286, pp. 17560-17568.
- HANAFY M.S., EL-BANNA A., SCHUMACHER H.M., JACOBSEN H.J., HASSAN F.S. (2013): *Enhanced tolerance to drought and salt stresses in transgenic faba bean (Vicia faba L.) plants by heterologous expression of the PR10 a gene from potato*, «Plant Cell Reports», 32, pp. 663-674.
- KAR R.K. (2013): *Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species*, «Plant Signaling & Behavior», 6, pp. 1741-1745.
- KRISHNAMURTHY A., RATHINASABAPATHI B. (2013): *Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling*, «Plant Signaling & Behavior», 8, doi: 10.4161/psb.25761.
- LOMBARDI L., FAORO F., LUTI S., BACCELLI I., MARTELLINI F., BERNARDI R., PICCIARELLI P., SCALA A. AND PAZZAGLI L. (2013): *Differential timing of defense-related responses induced by cerato-platanin and cerato-populin, two non-catalytic fungal elicitors*, «Physiologia Plantarum», 149, pp. 408-421.
- NEWMAN M.A., SUNDELIN T., NIELSEN J.T., ERBS G. (2013): *MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants*, «Frontiers in Plant Science», 4, pp. 1-14.
- PAZZAGLI L., CAPPUGI G., MANAO G., CAMICI G., SANTINI A., SCALA A. (1999): *Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic*

- protein from Ceratocystis fimbriata f. sp. platani*, «Journal of Biological Chemistry», 274, pp. 24959-24964.
- PAZZAGLI L., PANTERA B., CARRESI L., ZOPPI C., PERTINHEZ T.A., SPISNI A., TEGLI S., SCALA A., CAPPUGI G. (2006): *Cerato-Platanin, the First Member of a New Fungal Protein Family: Cloning, Expression, and Characterization*, «Cell Biochemistry and Biophysics», 44, pp. 512-521.
- PAZZAGLI L., SEIDL-SEIBOTH V., BARSOTTINI M., VARGAS W.A., SCALA A., PRASUN K., MUKHERJEE P.K. (2014): *Cerato-platanins: elicitors and effectors*, «Plant Science», *in press*.
- PITERKOVÁ J., LUHOVÁ L., MIESLEROVÁ B., LEBEDA A., PETŘIVÁLSKÝ M. (2013): *Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection*, «Plant Science», 207, pp. 57-65.
- RAFIQI M., ELLIS J.G., LUDOWICI V.A., HARDHAM A.R., DODDS P.N. (2012): *Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions*, «Current Opinion in Plant Biology», 15, pp. 477-482.
- RAMEGOWDA V., SENTHIL-KUMAR M., ISHIGA Y., KAUNDAL A., UDAYAKUMAR M., MYSORE K.S. (2013): *Drought Stress Acclimation Imparts Tolerance to Sclerotinia sclerotiorum and Pseudomonas syringae in Nicotiana benthamiana*, «International Journal of Molecular Sciences», 14, pp. 9497-9513.
- SCALA A., PAZZAGLI L., COMPARINI C., SANTINI A., TEGLI S., CAPPUGI G. (2004): *Cerato-platanin, an early produced protein by Ceratocystis fimbriata f.sp. platani, elicits phytoalexins synthesis in host and non-host plants*, «Journal of Plant Pathology», 86, pp. 23-29.

